GLYCERYL OLIGONUCLEOTIDE

Patent number: JP8208687
Publication date: 1996-08-13
Inventor: HOTODA HITOSHI; KOIZUMI MAKOTO; OMINE HISANORI; FURUKAWA HIDEHIKO; NISHIGAKI TAKASHI; ABE YASUSHI; KANEKO MASAKATSU
Applicant: SANKYO CO LTD
Classification:
- international: C07H21/04
- european:
Application number: JP19950301020 19951120
Priority number(s):

Abstract of **JP8208687**

PURPOSE: To obtain a new compound, a specific glyceryl oligonucleotide, useful as an anti-HIV agent having excellent anti-HIV activity and improved stability in blood by partially substituting deoxyribose with glycerol.
CONSTITUTION: This glyceryl oligonucleotide is shown by formula I [DBB is 3,4-(dibenzyloxy)benzyl; R<1> is guanin-9-yl or adenin-9-yl; R<2> is adenin-9-yl, guanin-9-yl, cytosin-1-yl, thymin-1-yl or uracil-1-yl; (m) is integer of 0 or 1-6; (n) is an integer of 1-6; m+n is 2-10], has excellent anti-HIV activity and improved stability in blood). The compound is obtained by introducing a nucleic acid base into a protected glycerol of formula II, reacting the resultant substance with 4,4'-dimethoxytrityl chloride, reacting the resulting substance with succinic anhydride to give a compound of formula III (R<3> is a nucleic acid base; DMT is 4,4'-dimethoxytrityl), subjecting the compound to extension reaction by phosphoamidite method and deprotecting.

(19)日本国特許庁（ＪＰ）

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号
特開平8－208687

(43)公開日　平成８年(1996)８月13日

(51)Int.Cl.⁶　識別記号　庁内整理番号　ＦＩ　技術表示箇所
Ｃ０７Ｈ　21/04　Ｚ
// Ａ６１Ｋ　31/70　ＡＤＹ

審査請求　未請求　請求項の数４　ＯＬ　（全 16 頁）

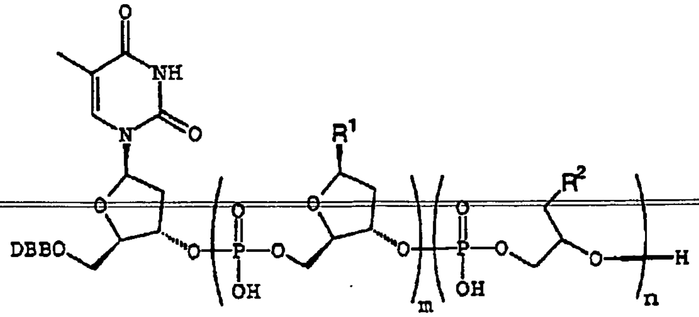
(21)出願番号　特願平7－301020
(22)出願日　平成７年(1995)11月20日
(31)優先権主張番号　特願平6－291207
(32)優先日　平６(1994)11月25日
(33)優先権主張国　日本（ＪＰ）

(71)出願人　000001856
三共株式会社
東京都中央区日本橋本町３丁目５番１号
(72)発明者　穂戸田　仁
東京都品川区広町１丁目２番58号　三共株式会社内
(72)発明者　小泉　誠
東京都品川区広町１丁目２番58号　三共株式会社内
(72)発明者　大峰　寿典
東京都品川区広町１丁目２番58号　三共株式会社内
(74)代理人　弁理士　大野　彰夫　（外２名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　グリセリルオリゴヌクレオチド

(57)【要約】
【課題】本発明は、優れた抗ＨＩＶ活性を有し、しかも、優れた安定性も有する抗ＨＩＶ剤を提供することを目的とする。
【解決手段】一般式
【化１】



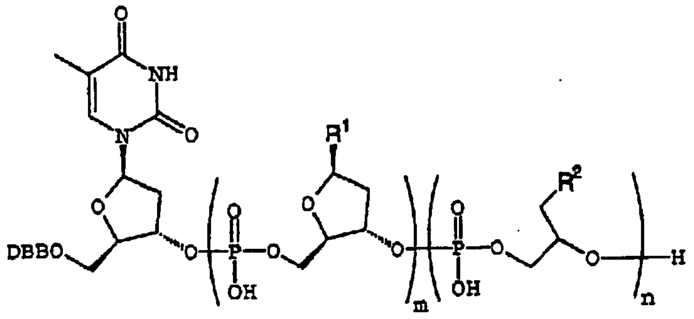
(1)

［式中、ＤＢＢは３、４－（ジベンジルオキシ）ベンジル基；R^1 はグアニル又はアデニル基；R^2 はアデニル、グアニル、シトシル、チミニル又はウラシリル基；ｍは０又は１乃至６；ｎは１乃至６。但し、ｍ及びｎの和は２乃至１０］で表される化合物及びその塩。

【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式　＊

＊【化1】



（1）

［式中、DBBは3、4−（ジベンジルオキシ）ベンジル基を示し、R^1 はそれぞれ独立にグアニン−9−イル又はアデニン−9−イル基を示し、R^2 はそれぞれ独立にアデニン−9−イル、グアニン−9−イル、シトシン−1−イル、チミン−1−イル又はウラシル−1−イル基を示し、mは0又は1乃至6の整数を示し、nは1乃至6の整数を示す。但し、m及びnの和は2乃至10である。］で表される化合物及びその塩。

【請求項2】請求項1において、R^2 がグアニン−1−イル基である化合物及びその塩。

【請求項3】請求項1において、m及びnの和が5であり、塩基配列がＴＧＧＧＧＧ又はＴＧＧＧＡＧである化合物及びその塩。

【請求項4】請求項1において、m及びnの和が6であり、塩基配列がＴＧＧＧＡＧＧである化合物及びその塩。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗ＨＩＶ活性を有するオリゴデオキシリボヌクレオチド誘導体で、一部のデオキシリボースをグリセロールに置き換え、血中安定性を向上させた、グリセリルオリゴヌクレオチド誘導体に関する。

【０００２】

【従来の技術】近年、オリゴヌクレオチド誘導体が、種々の生物活性を示すことがわかってきた。例えば、Calabrettaらは、慢性骨髄性白血病に対する１８量体のアンチセンスオリゴヌクレオチドを報告した（B.Calabretta et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88,2351-2355(1991)）。また、Griffin らは、１５量体のオリゴヌクレオチドがトロンビン阻害剤として作用することを報告した(L.C.Griffin et al, Gene, 137,25-31(1994))。しかし、これらのオリゴヌクレオチド誘導体は天然型の構造であり、天然型のオリゴヌクレオチドは、血中での分解が非常に早いことが知られている(S. Akhtar et al, Li

手段として、リン酸ジエステル結合をチオエートに変換する方法が知られている。例えば、Agrawal らは、抗ＨＩＶ−１活性を有するホスホロチオエート型の２５量体のオリゴヌクレオチドを報告した(A. Agrawal et al,Clin. Res.,42,282A(1994))。しかし、ホスホロチオエート型のオリゴヌクレオチドは非常に多くのジアステレオマーの混合物となり、単一の化合物を得ることが困難であった。

【０００４】一方、本発明者らは、５’−末端が修飾された短鎖のオリゴヌクレオチドが、抗ＨＩＶ−１活性を示すことを報告した（特開平５−１３８５１７号）。

【０００５】

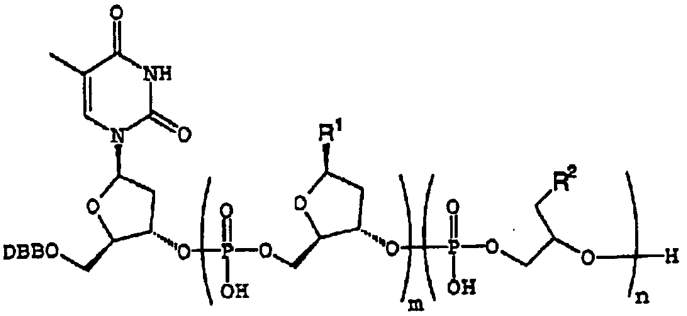
【発明が解決しようとする課題】生理活性を有するオリゴヌクレオチド誘導体として、オリゴヌクレオチド部分が天然型の化合物は、血中安定性が低いことが知られている。また、血中安定性を向上させるために、オリゴヌクレオチド部分をホスホロチオエート型にした化合物は非常に多くのジアステレオマーの混合物になってしまう。従って、オリゴヌクレオチド部分がジアステレオマーの混合物とならない形で修飾することにより、血中安定性が向上するような、生理活性を有するオリゴヌクレオチド誘導体の開発が望まれている。

【０００６】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記の課題を解決すべく鋭意研究の結果、抗ＨＩＶ−１活性を有するオリゴヌクレオチド誘導体のリボース部分をグリセロールに置き換えた化合物が血中のヌクレアーゼによる分解に対して非常に安定で、ジアステレオマーの混合物とならず、強い抗ＨＩＶ−１活性を有することを見出した。また、これらのオリゴヌクレオチド誘導体の合成にあたっては、グリセリルヌクレオシドホスホロアミダイト中間体が有用であることを見出した。

【０００７】本発明のグリセリルオリゴヌクレオチドは、一般式

【０００８】



(1)

【0009】［式中、DBBは3、4－（ジベンジルオキシ）ベンジル基を示し、R^1 はグアニン－9－イル又はアデニン－9－イル基を示し、R^2 はアデニン－9－イル、グアニン－9－イル、シトシン－1－イル、チミン－1－イル又はウラシル－1－イル基を示し、mは0又は1乃至6の整数を示し、nは1乃至6の整数を示す。但し、m及びnの和は2乃至10である。］で表される化合物及びその塩である。

【0010】一般式（1）において、R^2 は好適にはグアニン－9－イル基であり、m及びnの和は好適には5、6又は7であり、さらに好適には5又は6である。

【0011】また、R^3 の「イミド基に保護基を有していてもよいチミン－1－イル若しくはウラシル－1－イル基」の保護基としては、アシル型の保護基であれば特に限定はないが、好適にはベンゾイル基又はアニソイル基である。

【0012】一般式（1）の化合物のうち、好適な化合物としては、下記の［A群］に示す塩基配列をもつ化合物があげられ、さらに好適には［B群］に示す塩基配列をもつ化合物があげられる。なお、Tはチミン残基を、Gはグアニン残基を、Aはアデニン残基を示す。

【0013】［A群］TGGGGG、TGGGAG、TGGGAGG、TGGGGGG、TGGGGAG、TGGGGTG、TGGGGGTG、TGGGGCG、TGGGGUG、TGGGAGGG、TGGGAGTG、TGGGTGGG、TGGGGTGGG、TGGGGTTGGG、TGGGAGG、TGGGGAAGG、TGGGGTTGGTG、TGGGGTTGGGG。

［B群］TGGGGG、TGGGAG、TGGGAGG。

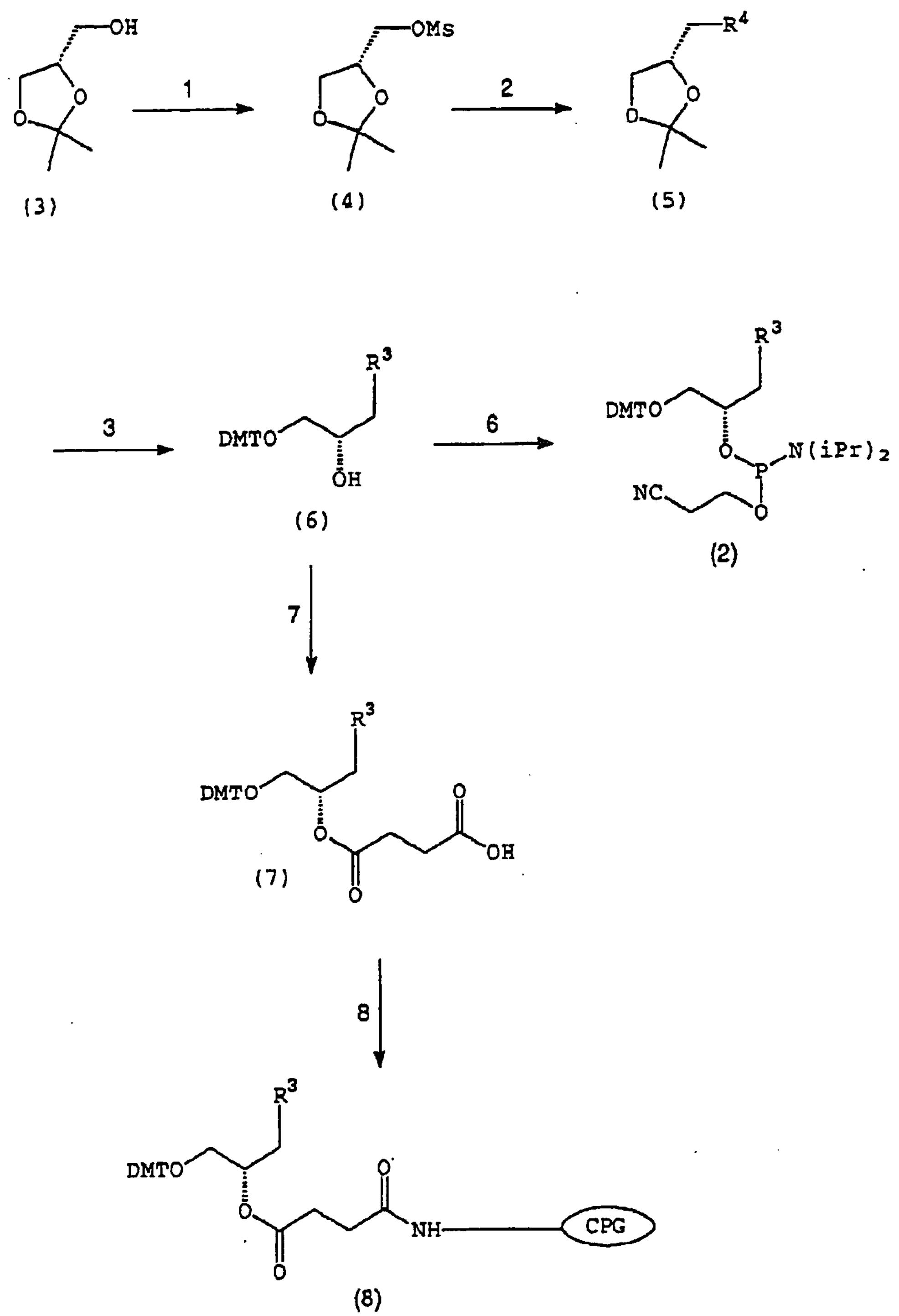
【0014】

【発明の実施の形態】

（製造方法）次に本発明のグリセリルオリゴヌクレオシチドの製造方法について説明する。

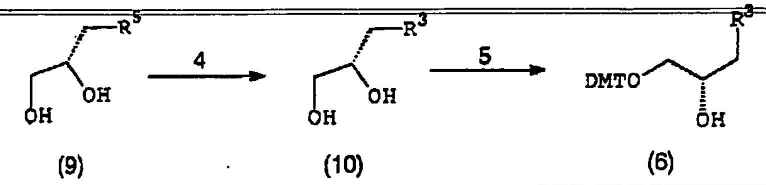
【0015】

【化3】



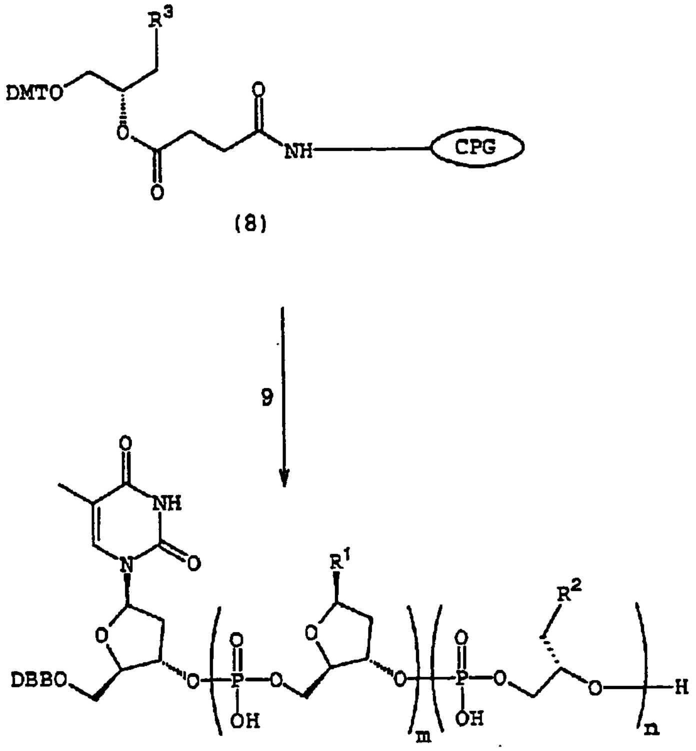
【0016】

＊　＊【化4】



【0017】

【化5】



(1a)

【0018】工程表中、R^1 、R^2 、R^3 、m及びnは前述のものを示し、R^4 は2－アミノ－6－クロロプリン－9－イル基を示し、R^5 はアデニン－9－イル、シトシン－1－イル、チミン－1－イル又はウラシル－1－イル基を示し、Msはメタンスルホニル基を示し、iPrはイソプロピル基を示し、DMTは4、4’－ジメトキシトリチル基を示し、CPGはコントロールドポアグラスを示す。

【0019】以下に、各工程について、詳しく説明する。

【0020】（第1工程）メシル化

本工程は、不活性溶剤中、化合物（3）に、塩基の存在下、メタンスルホニルクロリドを反応させて、化合物（4）を得る工程である。

【0021】使用される溶剤としては、反応を阻害せず、原料化合物をある程度溶解するものであれば特に限定はないが、好適には、メチレンクロリド、クロロホルム、ジクロロエタンのようなハロゲン化炭化水素類（特にメチレンクロリド）である。使用される塩基としては、トリエチルアミン、ピリジン等の有機アミン（特にトリエチルアミン）があげられる。

【0022】反応温度及び反応時間は、原料、試薬により異なるが、0乃至40℃で、30分乃至5時間である。

【0023】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

グネシウムで乾燥する。乾燥剤を濾去し、減圧下、溶剤を留去することにより得ることができる。

【0025】得られた目的化合物は必要ならば、常法、例えば再結晶、再沈殿又はクロマトグラフィー等によって更に精製できる。

【0026】（第2工程）2－アミノ－6－クロロプリンの導入

本工程は、不活性溶剤中、化合物（4）に、塩基の存在下、2－アミノ－6－クロロプリンを反応させて、化合物（5）を得る工程である。

【0027】使用される溶剤としては、反応を阻害せず、原料化合物をある程度溶解するものであれば特に限定はないが、好適には、ジメチルホルムアミドである。

【0028】使用される塩基は、好適には、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムのようなアルカリ金属炭酸塩である。

【0029】反応温度及び反応時間は、原料、試薬により異なるが、50乃至150℃で、10乃至48時間である。

【0030】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

【0031】例えば、溶剤を減圧下留去し、残渣に酢酸エチルを加えて溶解し、飽和重曹水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶剤を減圧下留去することにより得ることができる。

【0032】得られた目的化合物は必要ならば、常法、

【0033】（第3工程）クロルの加水分解、アミノ基の保護、ジメトキシトリチル化

本工程は、連続する3工程からなる。

3a）不活性溶剤中、化合物（5）に、希塩酸等の無機酸を加え、80乃至150℃で、30分乃至2時間、反応させる。終了後、氷冷下、水酸化ナトリウム水溶液で中和し、溶剤を減圧下留去する。残渣をピリジンを用いて、3回共沸して乾燥させ、そのまま、次工程に用いる。

【0034】3b）3aで得られる化合物を無水ピリジンに懸濁させて、−20乃至5℃で撹拌しながら、トリメチルシリルクロリド（TMSCl）を滴下する。滴下が終了してから30分後に無水イソブチリル酸を加え、10乃至40℃で、30分乃至4時間攪拌する。その後、−20乃至5℃で、水を加え、さらに10乃至30分間攪拌し、濃アンモニア水を加えて30分乃至2時間攪拌する。

【0035】反応終了後、溶剤を減圧下に留去し、水を加えて溶解後、エーテル等の水と混和しない溶剤で洗浄する。水を減圧下に留去し、ピリジンを用いて共沸により乾燥して、目的化合物を得ることができる。

【0036】通常、目的化合物は、精製せずに次の工程に用いる。

【0037】3c）3bで得られる化合物を無水ピリジンに溶解し、4、4'−ジメトキシトリチルクロリドを加え、10乃至40℃で、1乃至10時間攪拌する。反応終了後、塩化メチレンで希釈し、飽和重曹水で洗浄する。有機層を乾燥剤で乾燥後、溶剤を留去し、残渣をクロマトグラフィーにて精製して、目的化合物を得ることができる。

【0038】（第4工程）TMS化、ベンゾイル化、加水分解

本工程は、化合物（9）を原料として、化合物（10）を得る工程である。

【0039】本工程は、連続した3工程からなる。

【0040】4a）ピリジン中、化合物（9）に、トリメチルシリルクロリドを反応させ，10乃至40℃で、30分乃至2時間攪拌する。

【0041】4b）終了後、反応液へ、ベンゾイルクロリドを加え、10乃至40℃で、30分乃至5時間攪拌する。

【0042】4c）終了後、反応液へ水を加え、10乃至40℃で、5分乃至2時間攪拌する。

【0043】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

【0044】例えば、溶剤を減圧下留去し、残渣に塩化メチレンを加えて溶解し、飽和重曹水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶剤を減圧下留去することに

例えば再結晶、再沈殿又はクロマトグラフィー等によって更に精製できる。

【0046】（第5工程）ジメトキシトリチル化

本工程は、ピリジン中、化合物（10）に、ジメトキシトリチルクロリドを反応させて、化合物（6）を得る工程である。

【0047】反応温度及び反応時間は、原料、試薬により異なるが、10乃至40℃で、3乃至12時間である。

【0048】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

【0049】例えば、溶剤を減圧下留去し、残渣に塩化メチレンを加えて溶解し、飽和重曹水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶剤を減圧下留去することにより得ることができる。

【0050】得られた目的化合物は必要ならば、常法、例えば再結晶、再沈殿又はクロマトグラフィー等によって更に精製できる。

【0051】（第6工程）3価のリンの導入

本工程は、塩化メチレン中、化合物（6）に、1H−テトラゾールジイソプロピルアミン塩の存在下、2−シアノエチル−N，N，N'，N'−テトライソプロピルホスホロジアミダイトを反応させて、本発明の目的中間体（2）を得る工程である。

【0052】反応温度及び反応時間は、原料により異なるが、0乃至40℃で、10分乃至48時間である。

【0053】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

【0054】例えば、溶媒を減圧下留去し、水と混和しない溶剤、例えば酢酸エチルを加え、残さを溶解し、氷冷した炭酸ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、減圧下、溶剤を留去することにより得ることができる。

【0055】得られた目的化合物は必要ならば、常法、例えば再結晶、再沈殿又はクロマトグラフィー等によって更に精製できる。

【0056】（第7工程）コハク酸残基の導入

本工程は、ピリジン中、化合物（6）に、ジメチルアミノピリジンの存在下、無水コハク酸を反応させて、化合物（7）を得る工程である。

【0057】反応温度及び反応時間は、原料により異なるが、0乃至40℃で、10乃至48時間である。

【0058】反応終了後、目的化合物は、常法に従い、反応混合物から採取される。

【0059】例えば、溶媒を減圧下留去し、水と混和しない溶剤、例えば酢酸エチルを加え、残さを溶解し、10％クエン酸水溶液及び水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、減圧下、溶剤を留去

例えば再結晶（特にアセトニトリルを用いて）等によって更に精製できる。

【0061】（第8工程）CPGとの結合
本工程は、化合物（7）を原料として、化合物（8）を得る工程である。

【0062】本工程は、連続した3工程からなる。

【0063】8a）化合物（7）を、テトラヒドロフランとピリジンに溶解し、ペンタクロロフェノール及びジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）を加え、－20乃至5℃で30分乃至2時間攪拌した後に、10乃至40℃で12乃至24時間攪拌する。反応終了後、不溶物を濾過して除き、溶剤を減圧下に留去する。

【0064】得られた目的化合物は必要ならば、常法、例えばクロマトグラフィー等によって更に精製できる。

【0065】8b）8aで得られたら化合物を、ピリジンを用いて共沸して乾燥させた後に、ジメチルホルムアミド（DMF）に溶解し、アミノプロピルCPG（CPG INC．；AMP00500B；521A；120／200；85．7μmol／g）及びトリエチルアミンを加え、10乃至40℃で10乃至24時間放置する。得られる不溶物を濾過して集め、DMF及び塩化メチレンで洗浄する。

【0066】8c）8bで得られる化合物に無水酢酸とピリジンを加え、ジメチルアミノピリジンを加え、10乃至40℃で1時間放置する。得られる不溶物を濾過して集め、ピリジンと塩化メチレンで洗浄し、乾燥させることにより、目的化合物（8）を得ることができる。

【0067】（第9工程）伸長反応、脱保護、脱CPG
本工程は、通常のDNA合成機を用いた通常のオリゴデオキシヌクレオチドの合成に準じて行うことができる。

【0068】例えば、バイオサーチ（日本ミリポア・リミテッド）のCyclone™ Plus DNA／RNAシンセサイザーに、プログラムとしてアミダイトカートリッジを用いて伸長反応を行っていく。

【0069】この際、所望に応じ使用する各ユニット試薬としては、通常のアデニン及びグアニンに対応するβ－シアノエチルアミダイト溶液（35mMアセトニトリル溶液）、5′－O－（3，4－ジベンジルオキシベン＊＊ジル）チミジン－3′－O－（2－シアノエチル N，N－ジイソプロピル）ホスホロアミダイト（穂戸田ら、Nucleosides & Nucleotides，13，1375－1395（1994））のアセトニトリル溶液（35mM）、所望の化合物（2）のアセトニトリル溶液（35mM）である。

【0070】固相担体としては、5μmol の化合物（8）を用いる。

【0071】最後のユニットを縮合した後には酸処理を行なわない設定にしておき、コントロールドポアグラス（CPG）上に、保護されたオリゴヌクレオチドが構築された誘導体を得ることができる。これを減圧下乾燥し、カラムからとり出し、濃アンモニア水にひたして密閉し、10乃至40℃で2日間反応する。切断されたCPGを濾過により除き、水で洗浄し、ろ液と洗浄液を合わせて、ジエチルエーテルで洗浄し、減圧下にアンモニアとジエチルエーテルを除いた後、水溶液を濃縮する。これをミリポアフィルターで濾過した後に、逆相HPLC（Inertsil PREP－ODS，20×250mm；0．1M酢酸トリエチルアミン水溶液（TEAA），pH7；25→55％ CH_3CN／30min，linear gradient；7mL／min；254nm）にアプライし、16．9分に溶出する画分を集める。減圧下、アセトニトリルを留去し、凍結乾燥することにより本発明の目的化合物（1）を得ることができる。

【0072】化合物（3）又は（9）の光学活性体を用いることにより、所望の逆配位の本発明の化合物（1）を同様にして製造することができる。化合物（3）の光学活性体は、市販のものを用いることができる。化合物（9）の光学活性体は、公知の方法により製造することができる（A.Holy, Collection Czechoslov.Chem.Commun.,40,187(1975).）。

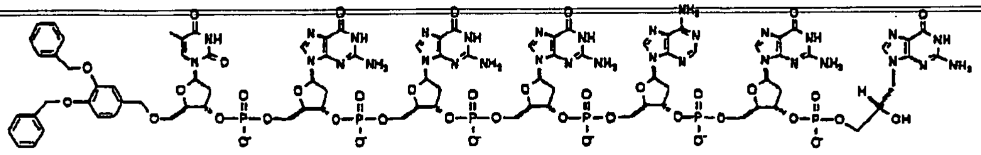
【0073】

【実施例】

（実施例1）

【0074】

【化6】



【0075】（1a）(R)－（2，2－ジメチル－1，3－ジオキソラン－4－イル）メチル メタンスルホネート

1．32g（10mmol）の（S）－（＋）－（2，2－ジメチル－1，3－ジオキソラン－4－イル）メタチレンに溶解し、0℃にて攪拌した。ここに、2．12mL（15．2mmol）のトリエチルアミンを加え、0．854mL（11mmol）のメシルクロリドを滴下して加えた。1時間後に50mLの水を加え、さらに10分間攪拌した。有機層を分取し、50mLづつの飽

標記目的化合物（ｏｉｌ）を得た。

【００７６】^{1}H－NMR(270MHz,CDCl$_3$)δppm : 4.38 (m,1H); 4.22(d,2H,J=5.28Hz); 4.11 (dd,1H,J=6.60,8.58Hz); 3.83(dd,1H,J=5.94,8.58Hz); 3.06(s,3H); 1.45 (s,3H); 1.37(s,3H).

（１ｂ）２－アミノ－６－クロロ－９－［（２，２－ジメチル－１，３－ジオキソラン－４－イル）メチル］プリン

（１ａ）で得られた化合物１．０５１ｇ（５ｍｍｏｌ）を９０ｍＬのジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）に溶かし、１．０５９ｇ（６．２５ｍｍｏｌ）の２－アミノ－６－クロロプリンと０．８８８ｇ（６．４３ｍｍｏｌ）のK_2CO_3を加え、９０℃にて一夜撹拌した。溶媒を減圧下留去した後に、１００ｍＬの酢酸エチルに溶解し、１００ｍＬの飽和重曹水で洗浄した。水層を１００ｍＬの酢酸エチルで２回抽出し、前の有機層と合わせて無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去した後に、１００ｇ（２３０－４００ｍｅｓｈ）のシリカゲルカラムにアプライし、２乃至３％メタノール－塩化メチレンで溶出して、０．９６２２ｇ（６８％）の標記目的化合物を得た。

【００７７】^{1}H－NMR(270MHz,DMSO-d$_6$)δppm : 8.08(s,1H); 6.92(s,2H); 4.52-4.43(m,1H); 4.20-4.10 (m,2H); 4.01(dd,1H,J=6.60,8.57Hz); 3.77(dd,1H,J=5.28,8.57Hz); 1.29(s,3H); 1.24(s,3H).

ＭＡＳＳ：283

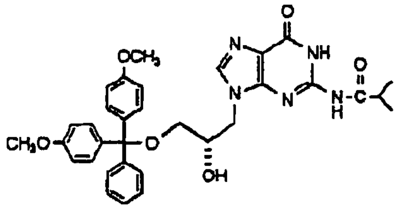
ＩＲ(KBr,cm^{-1}):3430,3312,3186,2984,2941,2860,1642,1616,1560,1517,1429.

ＵＶ(MeOH)ε：223(22300),248(4800),310(6000).

（１ｃ）

【００７８】

【化７】



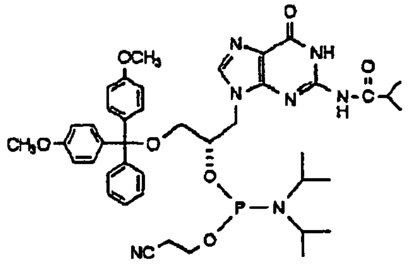
【００７９】（１ｂ）で得られた化合物９２５ｍｇ（３．２６ｍｍｏｌ）に２．７５ｍＬの水と０．５５ｍＬの１２Ｎ－ＨＣｌを加え、７５分間加熱還流した。反応容器を氷水浴にて冷却しながら、約２．６ｍＬの２．５Ｎ－ＮａＯＨにて中和した。溶媒を減圧下留去した後に、ピリジンで３回共沸して乾燥させた。３３ｍＬの乾燥ピリジンに懸濁させて、反応容器を氷水浴にて冷却しながら撹拌し、２．１ｍＬのＴＭＳＣｌを滴下して加えた。３０分後に２．８ｍＬの無水イソブチリル酸を加え、室温にもどして２時間撹拌した。反応容器を氷水浴間撹拌した。溶媒を減圧下に留去し、１００ｍＬの水に溶かした後に、１００ｍＬのエーテルで洗浄した。溶媒を減圧下に留去した後に、ピリジンで２回共沸して乾燥させた。３３ｍＬの乾燥ピリジンに溶かし、１．２６７ｇ（３．２６ｍｍｏｌ）のジメトキシトリチルクロリドを加えて撹拌した。３時間後に２００ｍｇのジメトキシトリチルクロリドを追加し、さらに２時間撹拌した。２００ｍＬの塩化メチレンで希釈して、１００ｍＬの飽和重曹水で３回洗浄した後に、無水硫酸マグネシウムにて乾燥させた。溶媒を留去した後に、１００ｇ（７０－２３０ｍｅｓｈ）のシリカゲルカラムにアプライし、１－４％メタノールを含む塩化メチレンにて溶出し、標記目的化合物を９２４．７ｍｇ（４７％）得た。

^{1}H－NMR(270MHz,CDCl$_3$)δppm:11.81(s,1H); 8.55 (s,1H); 7.54(s,1H); 7.47-6.81(m,13H); 4.90(brs,1H); 4.40-3.98(m,3H); 3.79(s,6H); 3.35-3.20(m,2H); 2.70-2.55(m,1H); 1.27-1.22(m,6H).

（１ｄ）

【００８０】

【化８】



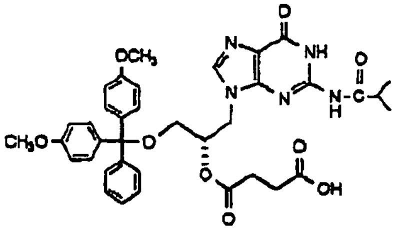
【００８１】（１ｃ）で得られた化合物６９０ｍｇ（１．１５ｍｍｏｌ）をピリジンで１回共沸して乾燥させた後に６ｍＬの塩化メチレンに溶かし、９８．８ｍｇ（０．５７７ｍｍｏｌ）の１Ｈ－テトラゾールジイソプロピルアミン塩と４０４μＬ（１．２７ｍｍｏｌ）の２－シアノエチル－Ｎ，Ｎ，Ｎ′，Ｎ′－テトライソプロピルホスホロジアミダイトを加え、室温で７時間２０分撹拌した。１００μＬの２－シアノエチル－Ｎ，Ｎ，Ｎ′，Ｎ′－テトライソプロピルホスホロジアミダイトと１０ｍｇの１Ｈ－テトラゾールジイソプロピルアミン塩を追加して、さらに室温で１４時間撹拌した。溶媒を留去した後に、５０ｍＬの酢酸エチルに溶かし、５０ｍＬの氷冷した１０％炭酸ナトリウム水で２回洗浄し、５０ｍＬの飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後溶媒を留去し、４０ｇ（７０－２３０ｍｅｓｈ）のシリカゲルカラムにアプライし、酢酸エチルで溶出して標記目的化合物を８０６．５ｍｇ（８８％）得た。

【００８２】^{1}H－NMR (270MHz,CDCl$_3$,mixture of diastereomers)δppm: 11.90,11.85(2s,1H); 8.65,8.31 (2s,1H); 7.54,7.49(2s,1H); 7.45-6.79(m,13H); 4.50 (brs,1H); 4.33 (d,2H,J=5.93Hz); 3.79(s,6H); 3.70-

（１ｅ）

【００８３】

【化９】



【００８４】（１ｄ）で得られた化合物１７９ｍｇ（０．３ｍｍｏｌ）をピリジンで１回共沸して乾燥させた後に、４．５ｍＬの乾燥ピリジンに溶かし、１２ｍｇ（０．１ｍｍｏｌ）のジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）と３０ｍｇ（０．３ｍｍｏｌ）の無水コハク酸を加え、室温で攪拌した。３時間後に１２ｍｇのＤＭＡＰを追加し、さらに１５時間３０分後に４１μＬ（０．３ｍｍｏｌ）のトリエチルアミンを加えた。さらに９０分後に３０ｍｇの無水コハク酸を加え、さらに２時間３０分後に６０ｍｇの無水コハク酸を加え、さらに２時間後に６０ｍｇの無水コハク酸を加えて、さらに１６時間３０分攪拌した。溶媒を減圧下に留去して、２０ｍＬの酢酸エチルに溶かし、２０ｍＬの１０％クエン酸水溶液で２回洗浄し、２０ｍＬの水で１回洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後に、溶媒を減圧下に留去して、アセトニトリルから再結晶して、若干無水コハク酸を含む標記目的化合物を１５１．８ｍｇ（７２．５％）得た。

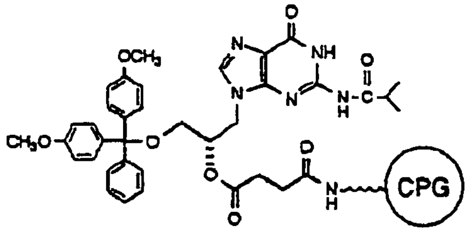
【００８５】^{1}Ｈ－ＮＭＲ(270MHz, $CDCl_3$)δ：9.49(s,1H)；7.56(s,1H)；5.22(brs,1H)；4.52-4.30(m,2H)；3.79(s,6H)；3.27-2.40(m,7H)；1.17(d,6H,J=7.26Hz).

（１ｆ）

【００８６】

【化１０】

＊



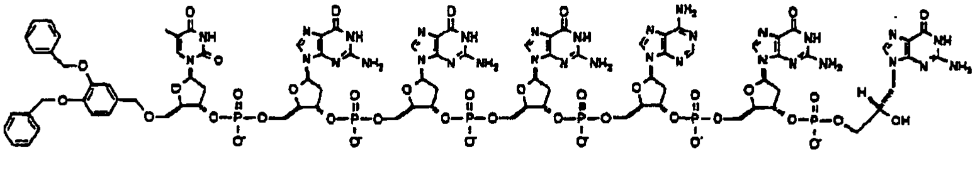
【００８７】（１ｅ）で得られた化合物１５１．８ｍｇ（０．２１７ｍｍｏｌ）をピリジンで２回共沸して乾燥させた後に、２ｍＬのテトラヒドロフランと５０μＬのピリジンに溶かし、５８ｍｇ（０．２１７ｍｍｏｌ）のペンタクロロフェノールと１１３ｍｇ（０．５５ｍｍｏｌ）のＤＣＣを加え、氷水浴中で攪拌した。１時間後に室温にもどし、さらに１６時間攪拌した。不溶物を濾過して除き、溶媒を減圧下に留去し、１０ｇ（７０－２３０ｍｅｓｈ）のシリカゲルカラムにアプライし、３％メタノールを含む塩化メチレンで溶出することにより２３９．４ｍｇの若干ジシクロヘキシルウレアを含む活性エステル誘導体を得た。これをピリジンで２回共沸して乾燥させた後に、１．２ｇのアミノプロピルＣＰＧ（ＣＰＧ ＩＮＣ．；ＡＭＰ００５００Ｂ；５２１Ａ；１２０／２００；８５．７μｍｏｌ／ｇ）と５ｍＬのＤＭＦと２８μＬ（０．２ｍｍｏｌ）のトリエチルアミンを加え、室温で放置した。１９時間後に不溶物を濾過して集め、ＤＭＦと塩化メチレンで洗浄した。９ｍＬのピリジンと１ｍＬの無水酢酸と１２２ｍｇ（１ｍｍｏｌ）のジメチルアミノピリジンを加え、室温で放置した。１時間後に不溶物を濾過して集め、ピリジンと塩化メチレンで洗浄し、乾燥させて、目的とする標記目的化合物を得た。グリセリルグアニン導入量をジメトキシトリチル基で定量したところ、４６．７μｍｏｌ／ｇであった。

【００８８】（１ｇ）

【００８９】

【化１１】

＊



【００９０】ミリジェン／バイオサーチ（日本ミリポア・リミテッド）のＣｙｃｌｏｎｅTMＰｌｕｓ ＤＮＡ／ＲＮＡシンセサイザーに、付属する合成用試薬類と、プログラムとして１５．０μｍｏｌｅアミダイトカートリッジを接続した。ただしこのとき、チミジンに対応するβ－シアノエチルアミダイト溶液のかわりに、３５ｍＭに調製した５′－Ｏ－（３，４－ジベンジルオキシベンジル）チミジン－３′－Ｏ－（２－シアノエチル Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）ホスホロアミダイト（穂戸田ら、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ ＆ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ

シアノエチルアミダイト溶液のかわりに、３５ｍＭに調製した（１ｄ）で得られた化合物のアセトニトリル溶液を用いた。固相担体として５μｍｏｌ分のグリセリルグアニン誘導体が結合した、（１ｆ）で得られた化合物を用い、プログラムにＴＧＧＧＡＧＣという塩基配列を入力し、最後のＴを縮合した後には酸処理を行なわない設定のプログラムを作動させることにより、コントロールドポアグラス（ＣＰＧ）上に、保護されたオリゴヌクレオチドが構築された誘導体を得た。これを減圧下乾燥したのちにカラムからとり出し、１０ｍＬの濃アンモニア

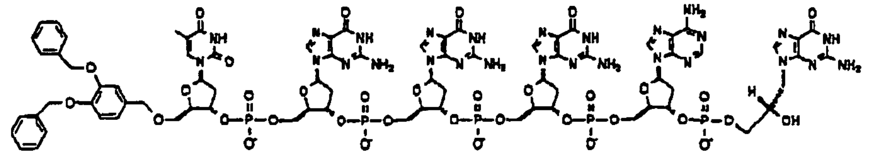
洗浄液を合わせて、30mLづつのジエチルエーテルで3回洗浄し、減圧下にアンモニアとジエチルエーテルを除き、水溶液を約3mLまで濃縮した。これを0．45ミクロンのミリポアフィルターで濾過した後に、逆相HPLC（Inertsil PREP－ODS, 20×250mm；0．1M酢酸トリエチルアミン水溶液（TEAA），pH7；25→55％ CH_3 CN／30min, linear gradient；7mL／min；254nm）に、3回に分けてアプライし、16．9分に溶出する画分を集めた。減圧下にアセトニトリルを留去したのちに凍結乾燥し、50mLの水にとかしてから再度凍結乾燥して、アモルファス状の標記目的化合物を85units（A260）得た。

【0091】UVmax：254nm

（実施例2）

【0092】

【化12】



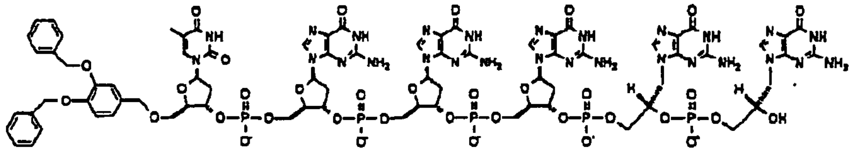
【0093】実施例1と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGGACという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を124units（A260）得た。

【0094】UVmax：255nm

（実施例3）

【0095】

【化13】



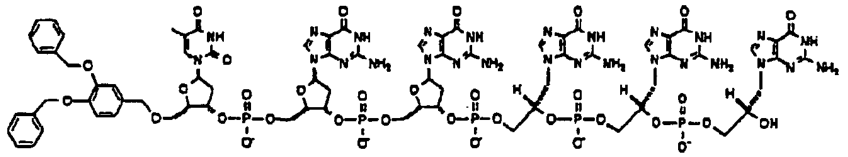
【0096】実施例1と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGGCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を48units（A260）得た。

【0097】UVmax：253nm

（実施例4）

【0098】

【化14】



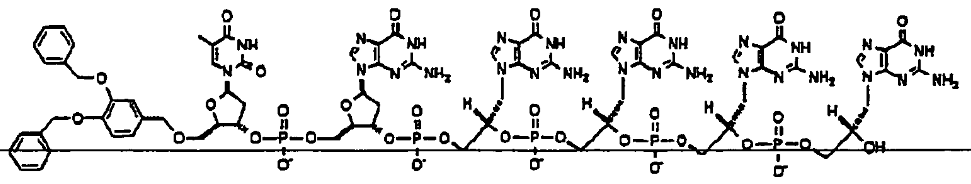
【0099】実施例1と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGCCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を74units（A260）得た。

【0100】UVmax：253nm

（実施例5）

【0101】

【化15】

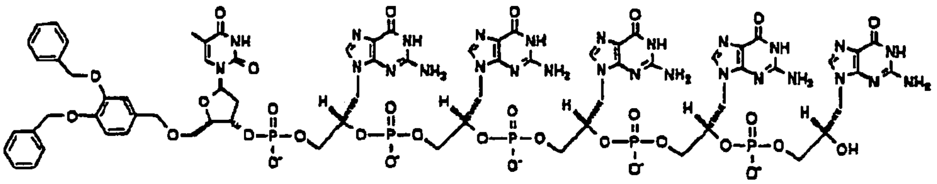


【0102】実施例1と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGCCCCという塩基配列を入力した。その結果、

【0103】UVmax：253nm

（実施例6）

【0104】



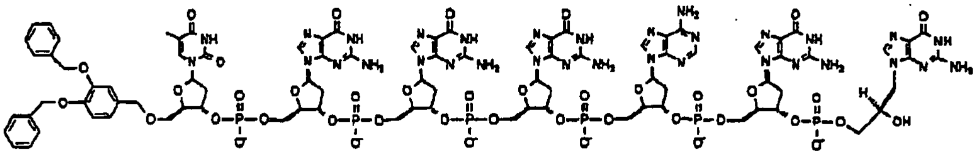
【０１０５】実施例１と同様にして合成した。ただし、プログラムにはＴＧＧＧＡＧＣという塩基配列のかわりにＴＣＣＣＣＣという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を７５ｕｎｉｔｓ（Ａ260）得た。

【０１０６】ＵＶｍａｘ：２５３ｎｍ

（実施例７）

【０１０７】

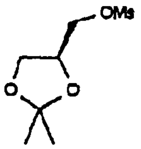
【化１７】



【０１０８】（７ａ）

【０１０９】

【化１８】

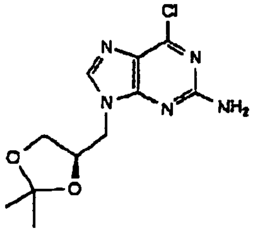


【０１１０】（Ｒ）－（－）－（２，２－ジメチル－１，３－ジオキソラン－４－イル）メタン（和光純薬）を用いて、実施例１（１ａ）と同様にして合成した。

【０１１１】（７ｂ）

【０１１２】

【化１９】

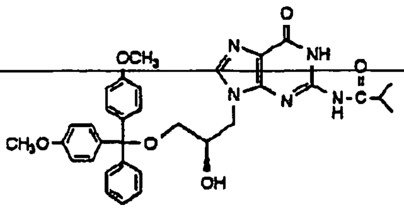


【０１１３】７ａで得られた化合物を用いて、実施例１（１ｂ）と同様にして合成した。

【０１１４】（７ｃ）

【０１１５】

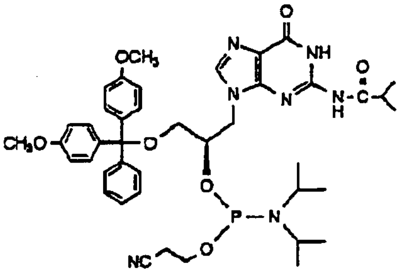
【化２０】



【０１１６】７ｂで得られた化合物を用いて、実施例１

【０１１８】

【化２１】

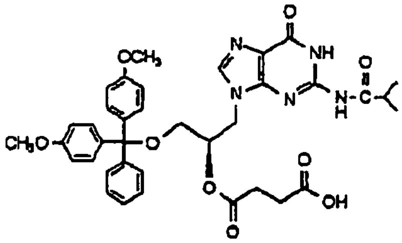


【０１１９】７ｃで得られた化合物を用いて、実施例１（１ｄ）と同様にして合成した。

【０１２０】（７ｅ）

【０１２１】

【化２２】

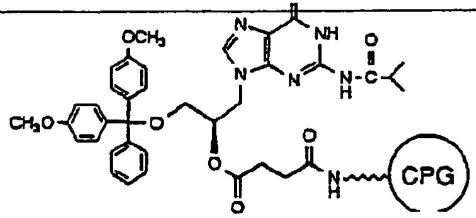


【０１２２】７ｃで得られた化合物を用いて、実施例１（１ｅ）と同様にして合成した。

【０１２３】（７ｆ）

【０１２４】

【化２３】

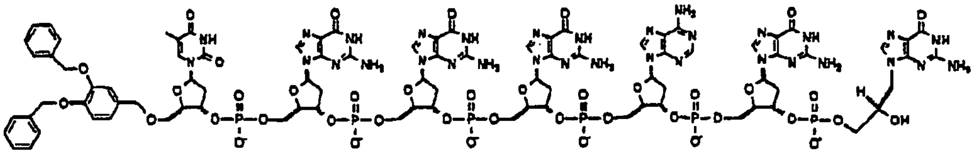


【0126】（7g）

【0127】

*【化24】

*



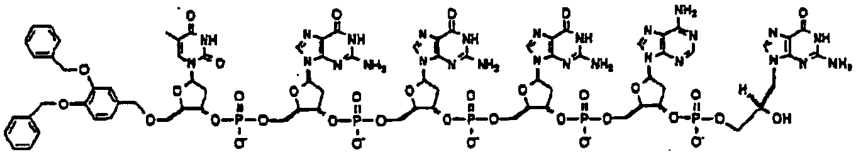
【0128】（7d）で得られた化合物及び（7f）で得られた化合物を、（1d）で得られた化合物及び（1f）で得られた化合物のかわりに用いて、実施例1（1g）と同様にして合成し、アモルファス状の標記目的化合物を64units（A260）得た。 ※

※【0129】UVmax：253nm

（実施例8）

【0130】

【化25】



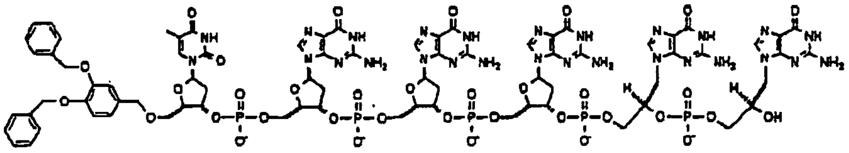
【0131】実施例7と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGGACという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を68units（A260）得た。 ★

★【0132】UVmax：255nm

（実施例9）

【0133】

【化26】



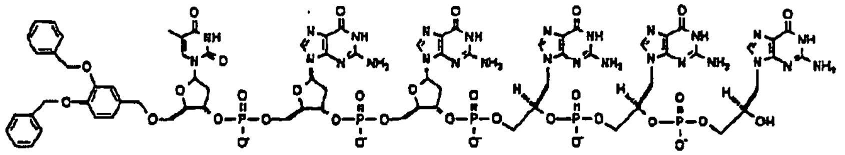
【0134】実施例7と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGGCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を54units（A260）得た。 ☆

☆【0135】UVmax：252nm

（実施例10）

【0136】

【化27】



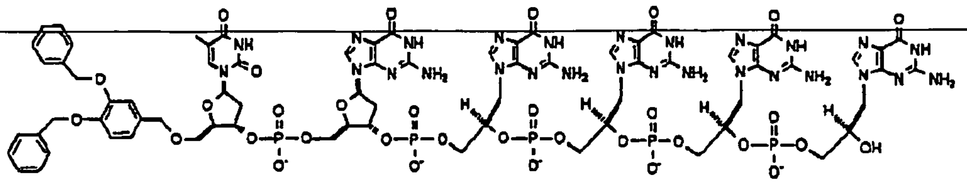
【0137】実施例7と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTGGCCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を48units（A260）得た。 ◆

◆【0138】UVmax：252nm

（実施例11）

【0139】

【化28】



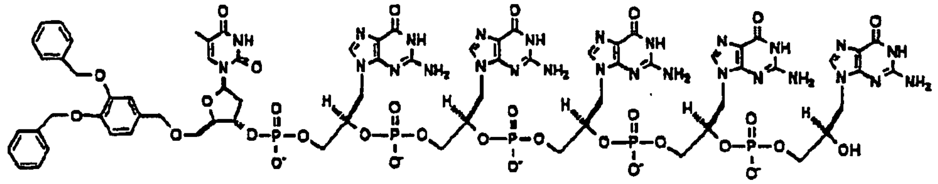
260）得た。

【0141】UVmax：252nm

（実施例12）＊

＊【0142】

【化29】



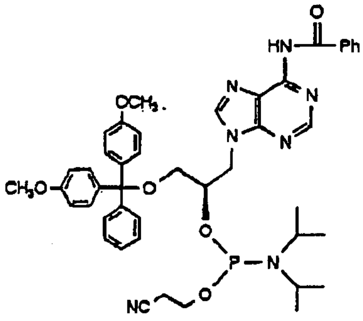
【0143】実施例7と同様にして合成した。ただし、プログラムにはTGGGAGCという塩基配列のかわりにTCCCCCという塩基配列を入力した。その結果、アモルファス状の標記目的化合物を83units（A260）得た。

【0144】UVmax：252nm

（実施例13）

【0145】

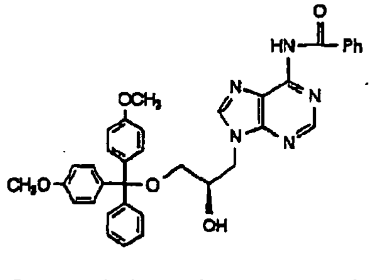
【化30】



【0146】（13a）

【0147】

【化31】



【0148】9−（R）−（2，3−ジヒドロキシプロピル）アデニン（A.Holy, Collection Czechoslov.Chem.Commun.,40,187(1975).）496mg（2.37mmol）をピリジンで共沸して乾燥させた後に、25mLのピリジンに溶解した。1.6mLのトリメチルシリルクロリドを加えて室温で30分間攪拌した後に、1.5mLの塩化ベンゾイルを加え、室温で一夜攪拌した。反応容器を氷水浴中で冷却しながら5mLの水を加えて15分間攪拌した後に、5mLの29％アンモニア水を加えて1時間攪拌した。溶媒を減圧下に留去した後に、残渣を25mLのH_2Oに溶かし、20mLのジエチルエ

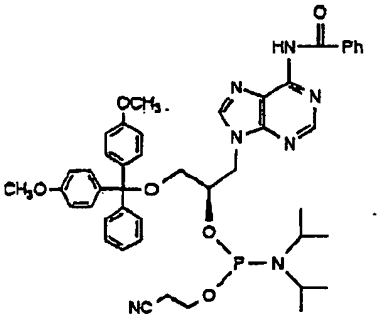
塩化メチレンでトリチュレートし、2.545gの粗結晶を得た。これをピリジンで共沸して乾燥させた後に、50mLのピリジンに溶かし、4，4’−ジメトキシトリチルクロリド813mg（2.4mmol）を加えて室温で18時間攪拌した。813mgの4，4’−ジメトキシトリチルクロリドを追加した後に、さらに6時間攪拌した。1mLのH_2Oを加えて反応を停止させ、200mLのクロロホルムで希釈した後に、200mLづつの5％$NaHCO_3$水で2回洗浄した。有機層をNa_2SO_4で乾燥した後に溶媒を減圧下留去し、残渣を100g（70−230mesh）のシリカゲルカラムにアプライし、0〜3％メタノール−塩化メチレンで溶出することにより、980.3mg（67％）の目的物を得た。

【0149】^{1}H−NMR(270MHz,CDCl$_3$) δ：9.14(s,1H)；8.74(s,1H)；8.06-6.80(m,19H)；4.52-4.15(m,3H)；3.78(s,6H)；3.25-3.12(m,2H).

（13b）

【0150】

【化32】



【0151】（13a）で得られた化合物123mg（0.2mmol）をピリジンで共沸して乾燥させた後に、1mLのテトラヒドロフランに溶かし、ジイソプロピルエチルアミン140μLと2−シアノエチルN，N−ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト70μLを加え、室温で攪拌した。1時間後に溶媒を留去し、残渣を50mLの酢酸エチルに溶かし、50mLづつの10％Na_2CO_3水で2回洗浄し、Na_2SO_4で乾燥した。減圧下に溶媒を留去した後に、残渣を40g（70−230mesh）のシリカゲルカラムにアプライし、

【0152】^{1}H－NMR(270MHz,CDCl$_3$)δ:9.07,9.06(2s,1H); 8.80,8.79(2s,1H); 8.08-6.79(m,19H); 4.63-4.30(m,3H); 3.79(s,3H); 3.78(s,3H); 3.72-3.40(m,4H); 3.33-3.12(m,2H); 2.51-2.36(m,2H); 1.12-0.97(m,12H).

【0153】

【製剤例】

（製剤例１）（ハードカプセル剤）
標準二分式ハードゼラチンカプセルの各々に、100 mgの粉末状の実施例化合物１、150 mgのラクトース、50 mgのセルロース及び6 mgのステアリン酸マグネシウムを充填することにより、単位カプセルを製造し、洗浄後、乾燥する。

【0154】（製剤例２）（ソフトカプセル剤）
消化性油状物、例えば、大豆油、綿実油又はオリーブ油中に入れた、実施例化合物１の混合物を調製し、正置換ポンプでゼラチン中に注入して、100 mgの活性成分を含有するソフトカプセルを得、洗浄後、乾燥する。

【0155】（製剤例３）（錠剤）
常法に従って、100 mgの実施例化合物１、0.2 mgのコロイド性二酸化珪素、5mgのステアリン酸マグネシウム、275 mgの微結晶性セルロース、11 mg のデンプン及び98.8 mg のラクトースを用いて製造する。

【0156】尚、所望により、剤皮を塗布する。

【0157】（製剤例４）（注射剤）
1.5 重量% の実施例化合物１、10容量% のプロピレングリコール中で撹拌し、次いで、注射用水で一定容量にした後、滅菌して製造する。

【0158】（製剤例５）（懸濁剤）
5 ml中に、100 mgの微粉化した実施例化合物１、100 mg＊のナトリウムカルボキシメチルセルロース、5 mgの安息香酸ナトリウム、1.0 g のソルビトール溶液（日本薬局方）及び0.025 mlのバニリンを含有するように製造する。

【0159】

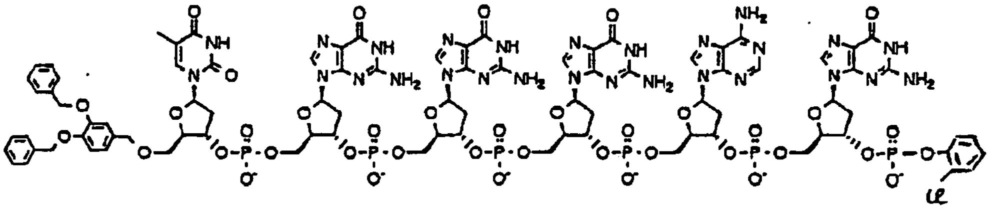
【試験例】

（試験例１）安定性試験
血液は、ヘパリン存在下、ＳＤ系雄性ラット腹部大動脈より採取した。採取後、速やかに4℃、3,000 rpm 、１５分間遠心分離して血漿を得た。得られた血漿１．４ｍＬ添加し、３７℃で４分間プレインキュベートした後、濃度３００μｇ／ｍＬの各基質を１００μＬ添加し、３７℃でインキュベートしながら経時的に１００μＬをサンプリングした。この時、１サンプル当たりの血漿及び基質濃度は、それぞれ９３．３％及び２０μｇ／ｍＬとなっている。

【0160】得られたサンプル１００μＬに、ライシスバッファー１００μＬ，等張リン酸塩緩衝液（ｐＨ７．４、ＰＢＳ）７０μＬ、２００ｍＭトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ８）１０μＬ、プロテイネースＫ（２５ｍｇ／ｍＬ）１０μＬ、液クロ定量のための内部標準物質（下記化３５に示す、２００μｇ／ｍＬ）１０μＬを添加し、６０℃、３０分間加温した。室温まで冷却した後、フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール混液（２５／２４／１）３００μＬで２回抽出した。さらに上清の水層にクロロホルム３００μＬを添加し、余分なフェノールを除去した。上清の水層をＨＰＬＣにて分析した。

【0161】

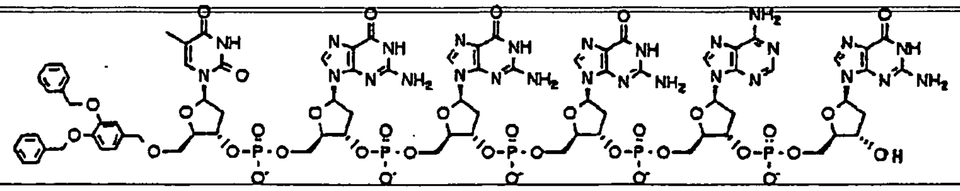
【化３３】



【0162】なお、対照化合物として、下記に示す化合物ａ（特願平６－９７７２号）を用いた。※

※【0163】

【化３４】



【0164】ＨＰＬＣ条件は以下の通りである。

【0165】装置：　島津ＬＣ－１０Ａ
カラム：Ｗａｋｏｐａｋ－ＷＳ－ＤＮＡ（４．６ｘ１５０mm）
溶媒：０．１Ｍトリエチルアミン－酢酸塩緩衝液（ｐＨ７）：アセトニトリル＝　７４：２６
感度：０．００５～０．０１ＡＵＦＳ
注入量：１０～２０μＬ

【表１】

	溶液中の残存量（０分を１００とした相対比）		
実施例	５分	３０分	１時間
2	92.89±1.26*	80.96±1.83	79.19±2.64
3	99.41±2.54	97.57±1.58	129.11±26.41
6	98.16±1.24	92.92±9.37	109.66±15.63
8	96.75±2.84	83.33±1.68	73.91±1.94
9	99.16±7.91	103.60±6.49	127.24±28.87
１２	100.45±2.70	102.72±6.67	102.90±17.17
化合物ａ	52.29±3.24	5.79±1.77	2.93±1.52

＊ｎ＝３

本発明の化合物は、血漿中での高い安定性を示した。

【０１６７】（試験例２）修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドの抗HIV-1 活性の測定

抗HIV-1 活性はパウエルらの方法によって測定した（R. Pauel et al., J. Virological Methods 20, 309-321(1988)）。すなわち，対数増殖期にあるＭＴ－４細胞を150 × gで5 分間遠心し，得られた細胞沈澱を培地にて懸濁したのちHIV-1（IIIB 型）を10 CCID$_{50}$ の濃度で37℃で1 時間感染させた。その後，牛胎児血清10% を含むRPMI-1640 培地（以下「血清培地」と称する）で遠心し、洗浄することによりHIV-1 感染ＭＴ－４細胞を得た。

【０１６８】HIV-1 感染MT-4細胞およびHIV-1 非感染MT-4細胞をそれぞれ4 ×10^5 細胞/ mlになるように血清培地に懸濁した。96穴プラスチックマイクロタイタープレート中にあらかじめ段階希釈した検体化合物溶液（血清培地に溶解したもの）を各穴に100 μl づつ入れ，次いでこの各穴に上記細胞懸濁液を各々100 μl づつ添加し，5%の炭酸ガス存在下で6 日間静置培養した。

【０１６９】同様に，検体化合物添加のHIV-1 感染MT-4細胞および検体化合物無添加のHIV-1 非感染MT-4細胞を培養した。

【０１７０】培養終了後，MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)法に基づき，生細胞数を測定し(L.M.Green et al., J. Immunol. Methods, 70, 257-268(1984))，HIV-1 による細胞障害活性を求めた。検体化合物無添加のHIV-1 感染MT-4細胞の細胞障害活性を100%とし、検体化合物無添加のHIV-1(IIIB 型）非感染ＭＴ－４細胞の細胞障害活性を０％として、HIV-1 感染ＭＴ－４細胞の細胞障害活性を５０％抑制しうる検体の濃度（ＩＣ$_{50}$）を求めた。また、検体化合物の細胞毒性活性として、HIV-1 非感染ＭＴ－４細胞の増殖を５０％抑制する濃度（ＣＣ$_{50}$）を求めた。これらの測定結果を表２に示す。

【０１７１】

【表２】

実施例	ＩＣ$_{50}$ (μg/ml)	ＣＣ$_{50}$ (μg/ml)
1	5.3	〉50
2	1.2	〉50
3	1.0	〉50
5	9.1	〉50
7	3.8	〉50
8	2.0	〉50
9	4.3	〉50
１１	4.3	〉50

その結果、表２にあげた修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドはいずれも，特に高い抗HIV-1 活性を有することが明らかとなった。

【０１７２】これらの化合物はいずれも１０μｇ／ｍｌ以下の濃度で抗HIV-1 活性を示した。

フロントページの続き

(72)発明者　古川　秀比古
東京都品川区広町１丁目２番58号　三共株

(72)発明者　西垣　隆
東京都品川区広町１丁目２番58号　三共株

(72)発明者　安部　康司
東京都品川区広町１丁目２番58号　三共株
式会社内

(72)発明者　金子　正勝
東京都品川区広町１丁目２番58号　三共株
式会社内